

Racemisierungsfreie Fragmentkondensation C-terminaler Pseudo-prolinpeptide an der Festphase**

Christian Heinlein, Daniel Varón Silva, Andrea Tröster, Jasmin Schmidt, Angelina Gross und Carlo Unverzagt*

Prof. Horst Kessler zum 70. Geburtstag gewidmet

Die jüngsten Fortschritte in der chemischen Proteinsynthese erlauben es, auch solche Modifikationen zu studieren, die nicht durch rekombinante Techniken zugänglich sind.^[1] Die derzeit leistungsfähigsten Methoden^[2] nutzen die selektive Verknüpfung von ungeschützten oder partiell geschützten Peptiden mit Peptidthioestern. Trotz vieler Verbesserungen bei den Peptidligrationsmethoden werden die benötigten Fragmente üblicherweise stufenweise durch Boc- oder Fmoc-basierte Festphasenpeptidsynthese aufgebaut. Aufgrund der Anreicherung von Nebenprodukten sind dadurch häufig nur Peptide mit bis zu 50 Aminosäuren zugänglich. Zusätzliche Schwierigkeiten bei der stufenweisen Verlängerung von Glycopeptiden führen zu noch kürzeren Peptiden. Wir haben eine konvergente Fragmentkondensation entwickelt, die auf dem Einbau von C-terminalen Pseudoprolinen basiert.^[3] Dadurch wird die Kupplung racemisierungsfrei, und es können Einschränkungen in der stufenweisen Synthese von Peptiden und Glycopeptiden überwunden werden.

Im Rahmen der Semisyntese der bovinen Ribonuclease C (RNase C) konnte der Glycopeptidthioester der RNase 26–39 über ein acetyliertes N-Glycan an einem Doppelklinker-Harz aufgebaut werden. Die versuchte Verlängerung des Glycopeptids um nur wenige Aminosäuren führte jedoch zu Sequenzfehlern aufgrund von Acetylwanderung sowie unvollständigen Kupplungen und Entschützungen.^[4] Beim Übergang zu ungeschützten Kohlenhydraten kann bei jeder Peptidverlängerung leicht eine zusätzliche O-Acylierung eintreten.^[5] Um diese Nebenreaktionen zu umgehen, haben wir konvergente Fragmentkupplungen an der Festphase^[6] zur Verlängerung von Glycopeptiden mit ungeschützten Zuckern untersucht. Ein gravierender Nachteil von Fragmentkupplungen ist die Racemisierung des C-Terminus der aktivierten Peptide, was durch Mikrowelleneinsatz noch verstärkt wird^[7] und sichere Kupplungen nur bei C-terminalen Glycin, Prolin^[6] oder O-Acylisopeptiden^[8] zulässt. Die kommerziell erhältlichen Pseudoprolindipeptide werden häufig als Löslichkeitsverbesserer in Peptidsynthesen eingesetzt, da sie racemisierungsfrei gekoppelt werden können.^[9]

[*] Dr. C. Heinlein, Dr. D. Varón Silva, A. Tröster, J. Schmidt, A. Gross, Prof. C. Unverzagt
Bioorganische Chemie, Gebäude NW1, Universität Bayreuth
95440 Bayreuth (Deutschland)
Fax: (+49) 921-555365
E-Mail: carlo.unverzagt@uni-bayreuth.de

[**] Diese Arbeiten wurden von der Deutschen Forschungsgemeinschaft und dem Fonds der Chemischen Industrie unterstützt.

Daher versuchten wir diese Eigenschaften auch bei Fragmentkupplungen einzusetzen, um so auch die häufigen Aminosäuren Serin und Threonin als sichere Kupplungsstellen zu nutzen. Die schwierige Sequenz des Glycopeptidthioesters der RNase 1–39 sollte durch drei Fragmentkupplungen an der Festphase aufgebaut werden (Schema 1).

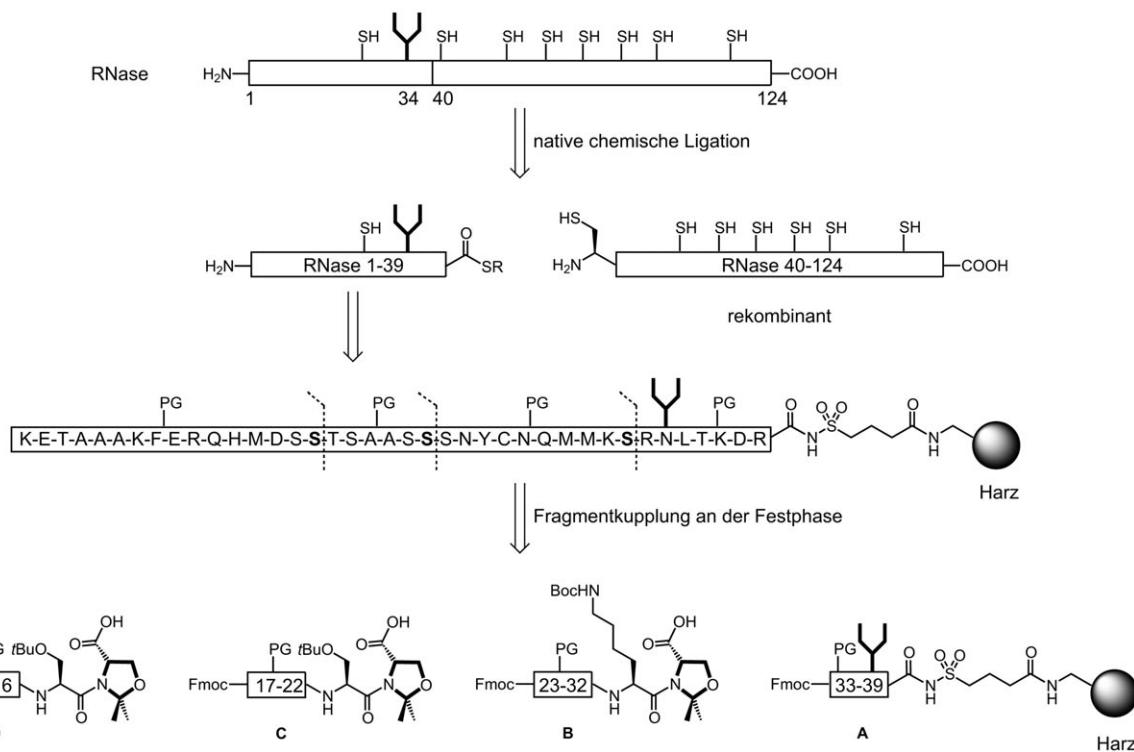
Überraschenderweise wurde der Vorschlag von Mutter et al., Pseudoproline auch für Fragmentkupplungen einzusetzen,^[9] bisher nur an drei Stellen kurz erwähnt.^[10] In einer Modellsynthese von Fragment **B** (Schema 1) wurde das Pseudoprolindipeptid Fmoc-Lys(Boc)-Ser($\Psi^{Me,Me}$ pro)-OH (**1a**) mit dem Tritylharz **2** verknüpft. Die Verlängerung nach üblichen Fmoc-Bedingungen (Piperidin/NMP; TBTU) führte zu Fragment **B**, allerdings in sehr niedriger Ausbeute.

Die Bestimmung des Fmoc-Gehalts in Kombination mit einem quantitativen Ninhydrintest zeigte, dass ein Peptidverlust bereits vor der Verlängerung zum Tripeptid auftrat. Eine HPLC-MS-Analyse der Abspaltlösung deutete auf die Bildung des Diketopiperazins **3** hin (Schema 2), das isoliert und strukturell durch NMR-Spektroskopie bestätigt wurde (siehe Hintergrundinformationen). Trotz der geringen Neigung von Tritylestern zur Diketopiperazinbildung wurde der *cis*-konfigurierte^[11] Pseudoprolinester **2b** rasch vom Harz durch intramolekulare Cyclisierung abgespalten.

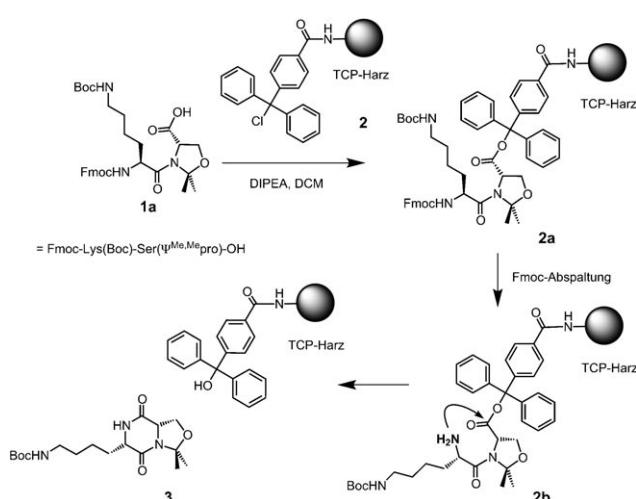
Daher wurde die Fmoc-Abspaltung und die Peptidbeladung des Harzes bei unterschiedlichen Abspaltbedingungen über freie Aminogruppen quantifiziert. Dazu musste zunächst das Dipeptid vom Harz abgespalten werden, da unter den Bedingungen des Ninhydrintests bereits die Diketopiperazinbildung eintrat (Hintergrundinformationen, Schema S1).

Die Fmoc-Abspaltung und die darauffolgende Cyclisierung hängen vom Linker und den Abspaltbedingungen ab. Am Trityllinker wurde das Pseudoprolindipeptid bereits nach 15 min in Gegenwart von 20% Piperidin/NMP vollständig abgespalten (Schema S2). Die gleichen Bedingungen ergaben am 2-Cl-Trt-Anker^[12] eine verzögerte Diketopiperazinbildung und Fmoc-Abspaltung (durch LC-MS zusätzlich bestätigt). Die Verwendung von 50% Piperidin beschleunigte beide Reaktionen, was jedoch zu einem sehr engen Zeitfenster führte. Mit DBU oder 1-Methylpyrrolidin^[13] wurde hauptsächlich die Diketopiperazinbildung verlangsamt, wobei die besten Resultate mit DBU/HOBt^[14] erhalten wurden.

Fragment **B** wurde daher an 2-Cl-Trt-Harz **4** aufgebaut (Schema 3). Nach der Entschützung von **4a** mit DBU/Piperidin/DMF (2:2:96) wurde die dritte Aminosäure gekuppelt.



Schema 1. Retrosynthese des Glycopeptidthioesters der RNase 1-39 über Fragmente mit C-terminalem Pseudoprolin. Fmoc = 9-Fluorenylmethoxycarbonyl, Boc = *tert*-Butyloxycarbonyl, PG = Schutzgruppe.



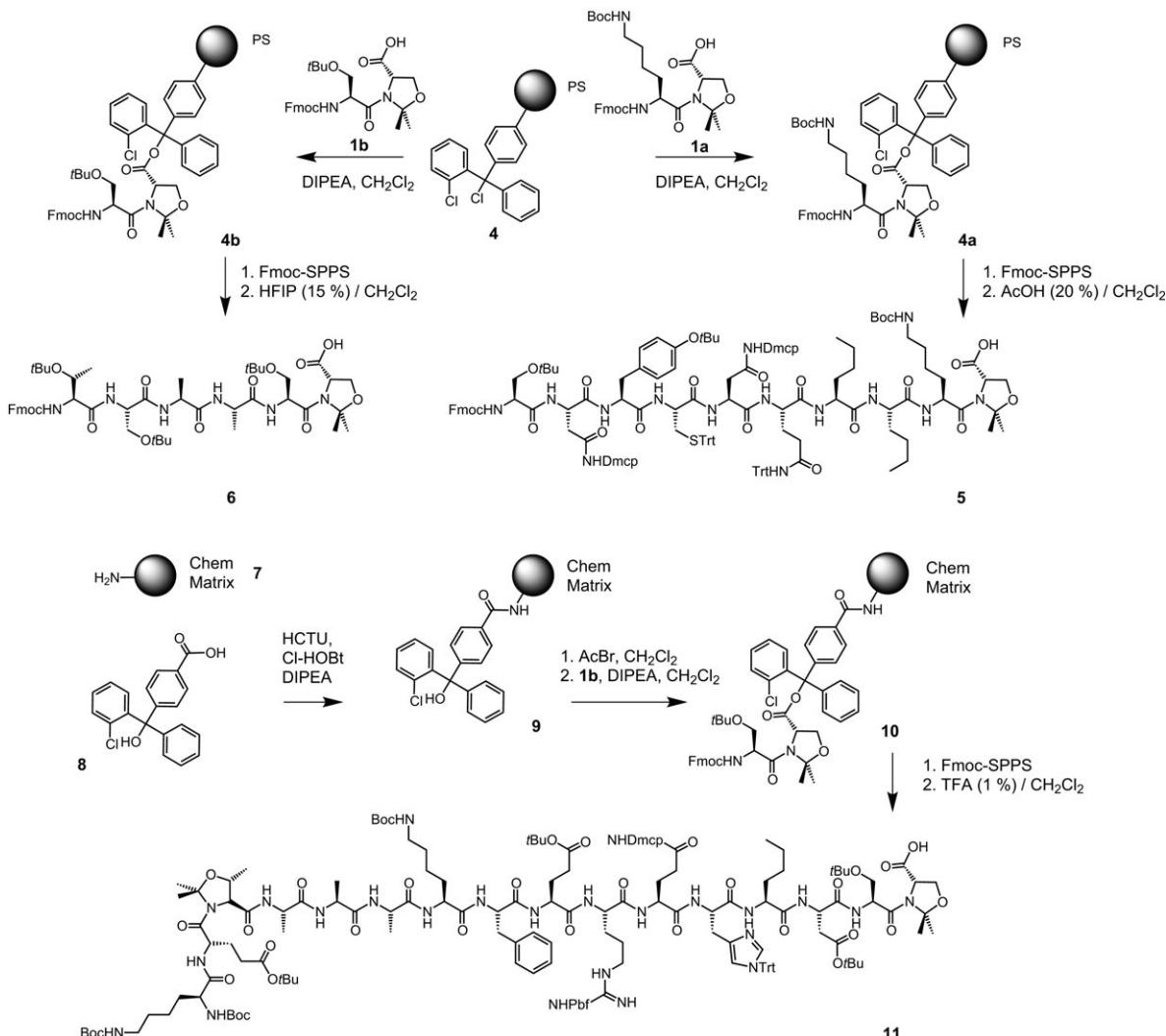
Schema 2. Tertiäre Pseudoprolindipeptidester (**2b**) werden als Diketopiperazin (**3**) abgespalten. DIPEA = Diisopropylethylamin

Die folgende Entschützung wurde mit 50 % Piperidin und verlängerter Abspaltungszeit durchgeführt, um noch verbliebenes Pseudoprolindipeptid vollständig abzuspalten (Schema S2). Durch den Einbau von Norleucin anstatt Methionin wurde die Bildung von Sulfoxiden verhindert.^[4] Nach der Peptidverlängerung wurde das Fragment **5** vom Harz durch 20 % AcOH/CH₂Cl₂ abgespalten, ohne das C-terminale Pseudoprolin zu öffnen. Eine Reinigung durch Gelfiltration ergab das Fragment **5** in 23 % Ausbeute.

Das Fragment RNase 17–22 (**6**) wurde analog aufgebaut. Durch Flashchromatographie konnte ein Nebenprodukt mit einem zusätzlichen Alaninrest entfernt und eine Ausbeute von 25 % erzielt werden.

Das 16-mer **D** wurde zunächst an 2-Cl-Trt-Polystyrolharz **4** aufgebaut. Das hydrophobe Peptid konnte jedoch nicht unter milden Bedingungen abspalten werden, und stärker saure Bedingungen führten zu einer Öffnung des terminalen Pseudoprolins. Da hydrophilere Varianten des 2-Cl-Trt-Harzes nicht kommerziell erhältlich waren, wurde Chem-Matrix-Harz **7** mit dem 2-Cl-Trt-Linker **8** verknüpft und nach der Aktivierung zum Bromid mit **1b** gekuppelt.^[15] Die Fmoc-Entschützung von **10** mit DBU-HOBt ließ sich durch einen Waschschritt mit 0,5 % HOBt weiter verbessern. Das hydrophobe Fragment konnte gut vom hydrophilen Harz abspalten werden und ergab 40 % Ausbeute nach Gelfiltration. Erst durch den Einbau des internen Pseudoprolins zeigte das Fragment **11** eine gute Löslichkeit in Acetonitril–Wasser.^[9]

Das Glycopeptid RNase 33–39 (**A**) wurde an einem Doppelkettner-PEG-Harz wie beschrieben aufgebaut.^[4] Eine Desacetylierung des GlcNAc-Rests mit verdünntem Hydrazinhydrat^[16] führte zu Glycopeptidharz **12**. Die drei Verlängerungen mit den Fragmenten **5**, **6** und **11** wurden mit jeweils zwei Äquivalenten an Pseudoprolinpeptid und PyBOP in NMP durchgeführt und ergaben einen vollständigen Umsatz nach 1 d bei Raumtemperatur oder nach 1 h im Mikrowellenreaktor^[7,17] bei 55 °C (Schema 4). Eine Epimerisierung konnte bei keiner der Kupplungsreaktionen gefunden werden. Nach der ersten und zweiten Kupplung war die Reinheit der Glycopeptide sehr hoch (Abbildung S5, S6). Erst nach der letzten Fragmentkupplung konnten im HPLC-



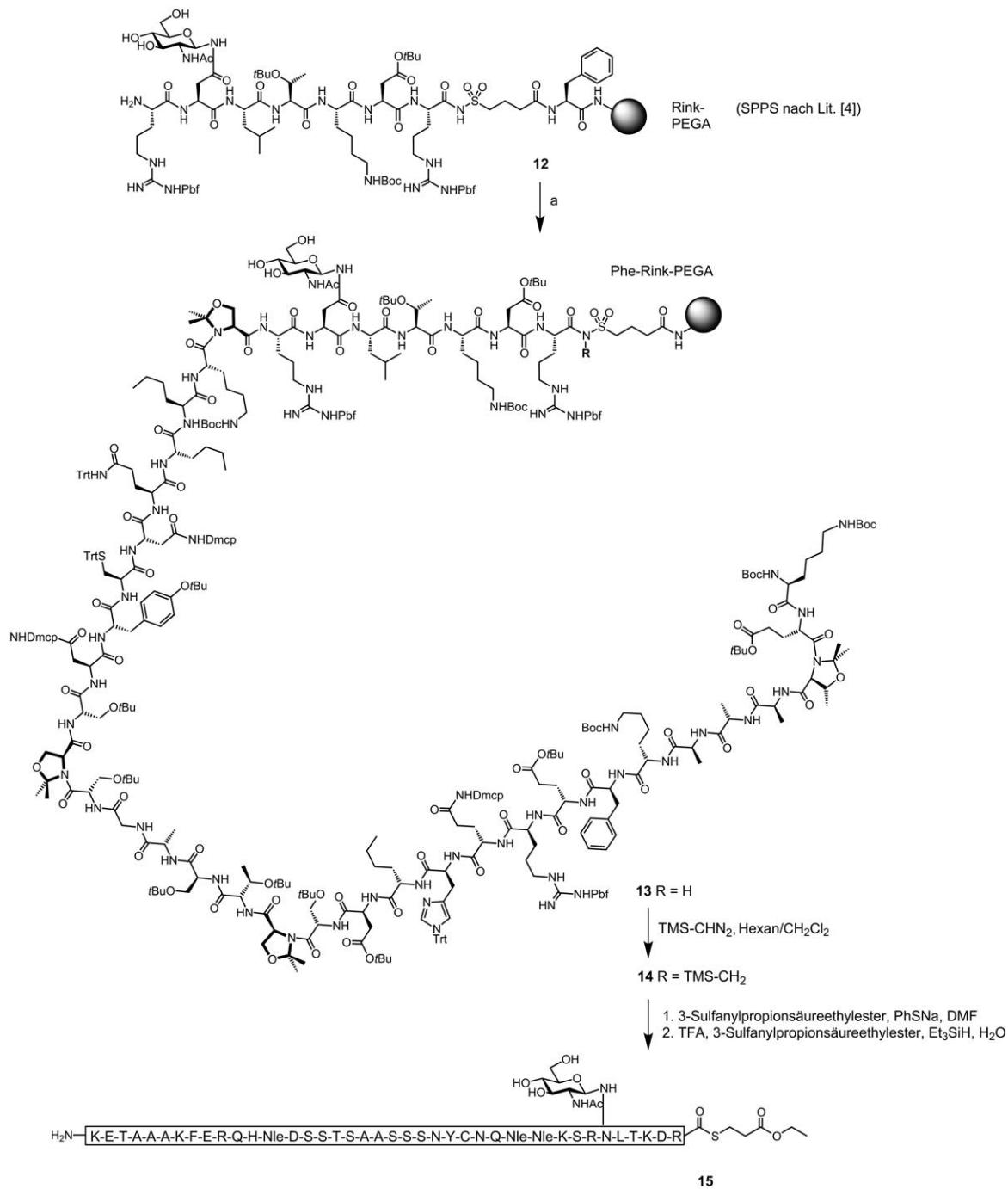
Schema 3. Synthese der Peptidylsäuren **5**, **6** und **11**. DMF = *N,N*-Dimethylformamid, DIC = *N,N*'-Diisopropylcarbodiimid, HOBr = 1-Hydroxybenzotriazol, NMP = *N*-Methylpyrrolidon, HFIP = 1,1,1,3,3,3-Hexafluorisopropylalkohol, Trt = Trityl, Dmcp = Dimethylcyclopropyl, HCTU = *N*-(1*H*-6-Chlorobenzotriazol-1-yl)-(dimethylamino)methylen)-*N*-methylmethanaminium-tetrafluoroborat-*N*-oxid, Pbf = 2,2,4,6,7-Pentamethyl-2,3-dihydro-1-benzofuran-5-sulfonyl, TFA = CF₃COOH.

Chromatogramm Deletionssequenzen gefunden werden, die aus Verunreinigungen des Fragments **11** stammten (Schema S7). Das Glycopeptid RNase 1–39 (**13**) wurde am Safety-Catch-Linker mit TMS-Diazomethan alkyliert^[18] und ergab nach Thiolyse und Entschützung den gewünschten Thioester der RNase 1–39 (**15**) in 23 % Ausbeute nach HPLC-Reinigung. Bei der GC-MS-Aminosäureanalyse (Hintergrundinformationen) des Thioesters **15** wurde nur 0.1 % d-Ser gefunden, wodurch sichergestellt werden konnte, dass die Pseudoprolin-basierte Segmentkondensation selbst unter Mikrowellenbedingungen (55 °C) racemisierungsfrei abläuft. Bereits unter konventionellen Segmentkupplungsbedingungen neigt Serin ohne C-terminales Pseudoprolin zu deutlicher Racemisierung.^[19]

Die Fragmentkupplungen mit C-terminalem Pseudoprolin wurden auf Glycopeptide mit einem ungeschützten Oligosaccharid übertragen. Dazu wurde Glycopeptid **16** wie beschrieben aufgebaut (Schema 5).^[4] Die Segmentkupplungen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt, da die Ver-

längerung mit dem kürzesten Fragment auch zu O-Acylierung des Zuckers führte (Abbildung S10). Die vorübergehende O-Acylierung konnte vor der Fmoc-Abspaltung am Harz^[16] durch Hydrazinhydrat rückgängig gemacht werden. In Anwesenheit des ungeschützten Nonasaccharids gestaltete sich die selektive N-Alkylierung des Safety-Catch-Linkers aufgrund der geringen Löslichkeit des Glycopeptids **17** schwierig. Trotz unvollständiger Aktivierung des Linkers und geringer O-Alkylierung des Zuckers konnte der Nonasaccharidglycopeptid-Thioester **19** in 9 % Ausbeute nach Entschützung und HPLC-Reinigung erhalten werden.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Aktivierung des Safety-Catch-Linkers wurde eine alternative Synthese von **19** an 2-Cl-Trt-ChemMatrix-Harz **9** durchgeführt (Schemata S5, S6, S7). Hierbei war die Kupplung der Glycosylaminosäure **24** und der Fragmente fast quantitativ, und die geringe O-Acylierung (Abbildung S16, S18) konnte durch Hydrazinolyse entfernt werden (Schema S17, S19). Das geschützte Glycopeptid RNase 1–39 wurde vom Harz **23** durch verdünnte TFA



Schema 4. Synthese des Thioesters der RNase 1–39 (**15**): a) Kupplung: Peptid **5**, **6** oder **11**, PyBOP, DIPEA (je 2 Äquiv.) in NMP, μ W (55°C , $2 \times 30 \text{ min}$); Entschützung: 20% Piperidin/NMP, PyBOP = Benzotriazolyl-1-oxytritylolidinophosphonium-hexafluorophosphat.

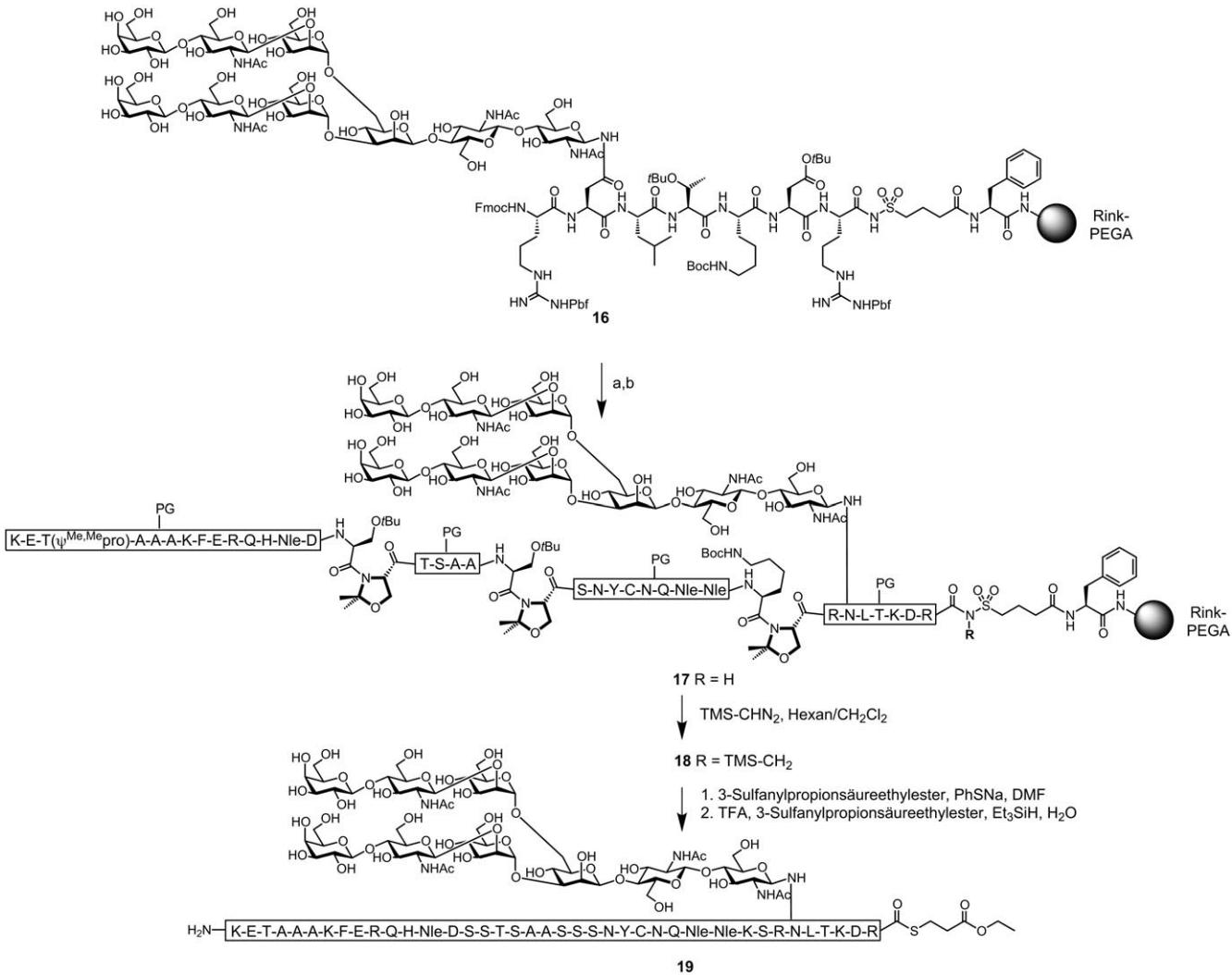
abgespalten und anschließend *in situ* zum Thioester umgesetzt (Schema S7).^[20] Nach Entschützung und HPLC-Reinigung konnte die Ausbeute des Thioesters der RNase 1–39 (**19**) signifikant gesteigert werden (13%).

Es konnte eine einfache Synthese von Peptidfragmenten mit C-terminalem Pseudoprolin an der Festphase entwickelt werden. Mit diesen Peptiden gelingen robuste und racemisierungsfreie Fragmentkupplungen an Serin und Threonin, was mit der konvergenten Synthese von anspruchsvollen Glycopeptidthioestern an der Festphase gezeigt wurde. Diese

Methode sollte auch die Synthese von Peptiden vereinfachen, die nicht direkt durch Ligationsstrategien zugänglich sind.

Eingegangen am 19. Februar 2011
Online veröffentlicht am 31. Mai 2011

Stichwörter: Festphasensynthese · Fragmentkupplungen · Glycopeptide · Peptidsynthese · Ribonuclease



Schema 5. Synthese des Thioesters der RNase 1–39 (**19**): a) Entschützung: 20% Piperidin/NMP; b) Kupplung: Peptid **5**, **6** oder **11**, PyBOP, DIPEA (je 2 Äquiv.) in NMP, 24 h.

- [1] C. P. Hackenberger, D. Schwarzer, *Angew. Chem.* **2008**, *120*, 10182; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2008**, *47*, 10030.
- [2] a) P. E. Dawson, T. W. Muir, I. Clark-Lewis, S. B. Kent, *Science* **1994**, *266*, 776; b) H. Hojo, S. Aimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1991**, *64*, 111.
- [3] T. Haack, M. Mutter, *Tetrahedron Lett.* **1992**, *33*, 1589.
- [4] C. Piontek, D. Varón Silva, C. Heinlein, C. Pöhner, S. Mezzato, P. Ring, A. Martin, F. X. Schmid, C. Unverzagt, *Angew. Chem.* **2009**, *121*, 1974; *Angew. Chem. Int. Ed.* **2009**, *48*, 1941.
- [5] Y. Kajihara, A. Yoshihara, K. Hirano, N. Yamamoto, *Carbohydr. Res.* **2006**, *341*, 1333.
- [6] P. Lloyd-Williams, F. Albericio, E. Giralt, *Tetrahedron* **1993**, *49*, 11065.
- [7] A. R. Katritzky, M. Yoshioka, T. Narindoshvili, A. Chung, N. M. Khashab, *Chem. Biol. Drug Des.* **2008**, *72*, 182.
- [8] T. Yoshiya, Y. Sohma, F. Fukao, A. Taniguchi, S. Nakamura, M. Skwarczynski, T. Kimura, Y. Hayashi, Y. Kiso, *Pept. Sci.* **2006**, *43*, 43.
- [9] T. Wöhr, F. Wahl, A. Nefzi, B. Rohwedder, T. Sato, X. Sun, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 9218.
- [10] a) Novabiochem in *Innovations*, Vol. 6/04, **2004**, <http://www.emdbiosciences.com/html/NBC/innovations.htm>; b) I. Coin, P. Schmieder, M. Bienert, M. Beyermann, *J. Pept. Sci.*

2008, *14*, 299; c) Genzyme in http://www.genzymepharmaceuticals.com/pdf/Genzyme_Pseudoproline_dipeptide_flyer.pdf, **2010**.

- [11] a) A. Nefzi, K. Schenk, M. Mutter, *Protein Pept. Lett.* **1994**, *1*, 66; b) P. Dumy, M. Keller, D. E. Ryan, B. Rohwedder, T. Woehr, M. Mutter, *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 918.
- [12] K. Barlos, D. Gatos, W. Schaefer, *Angew. Chem.* **1991**, *103*, 572; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1991**, *30*, 590.
- [13] X. Li, T. Kawakami, S. Aimoto, *Tetrahedron Lett.* **1998**, *39*, 8669.
- [14] A. B. Clippingdale, C. J. Barrow, J. D. Wade, *J. Pept. Sci.* **2000**, *6*, 225.
- [15] a) M. Quibell, L. C. Packman, T. Johnson, *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 11656; b) C. Zikos, E. Livaniou, L. Leondiadis, N. Ferderigos, D. S. Ithakissios, G. P. Evangelatos, *J. Pept. Sci.* **2003**, *9*, 419.
- [16] E. Bardaji, J. L. Torres, P. Clapes, F. Albericio, G. Barany, R. E. Rodriguez, M. P. Sacristan, G. Valencia, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1991**, 1755.
- [17] H. M. Yu, S. T. Chen, K. T. Wang, *J. Org. Chem.* **1992**, *57*, 4781.
- [18] R. Ingenito, E. Bianchi, D. Fattori, A. Pessi, *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *121*, 11369.
- [19] N. L. Benoiton, Y. C. Lee, R. Steinaur, F. M. Chen, *Int. J. Pept. Protein Res.* **1992**, *40*, 559.
- [20] S. Flemer, Jr., *J. Pept. Sci.* **2009**, *15*, 693.